

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/012625

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> A61B5/15, 5/00, G01N27/327

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> A61B5/15, 5/00, G01N27/327

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

|                           |           |                            |           |
|---------------------------|-----------|----------------------------|-----------|
| Jitsuyo Shinan Koho       | 1922-1996 | Toroku Jitsuyo Shinan Koho | 1994-2004 |
| Kokai Jitsuyo Shinan Koho | 1971-2004 | Jitsuyo Shinan Toroku Koho | 1996-2004 |

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| A         | WO 2002/073181 A1 (Koji HAYADE),<br>19 September, 2002 (19.09.02),<br>Full text; all drawings<br>(Family: none)   | 1-20                  |
| A         | JP 6-7324 A (N.V. Nederlandsche<br>Apparatenfabriek Nedap),<br>18 January, 1994 (18.01.94),<br>Full text; all drawings<br>& EP 554955 A1 & US 5372133 A | 1-20                  |

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
17 November, 2004 (17.11.04)

Date of mailing of the international search report  
07 December, 2004 (07.12.04)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> A61B5/15, 5/00, G01N27/327

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> A61B5/15, 5/00, G01N27/327

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1922-1996年

日本国公開実用新案公報 1971-2004年

日本国登録実用新案公報 1994-2004年

日本国実用新案登録公報 1996-2004年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

## C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の<br>カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示  | 関連する<br>請求の範囲の番号 |
|-----------------|--|------------------|
| A               | WO 2002/073181 A1 (早岐司) 2002. 09. 19, 全文, 全図 (ファミリーなし)   | 1-20             |
| A               | JP 6-7324 A (エヌ・ペー・ネグランド・シエ アパ ラテンファブ リエネグ・ツプ)<br>1994. 01. 18, 全文, 全図 & EP554955 A1 & US5372133 A | 1-20             |

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

17. 11. 2004

国際調査報告の発送日

07.12.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

荒巻 慎哉

2W

8703

電話番号 03-3581-1101 内線 3290

## 明 細 書

### グルコースセンサおよびグルコース濃度測定装置

#### 技術分野

[0001] 本発明は、試料中のグルコース濃度を測定するための技術に関する。

#### 背景技術

[0002] 糖尿病患者にとっては、自己の血糖値を把握しておくことが重要であり、またインシュリンを投与するタイミングを、血糖値を繰り返し測定することにより決定する必要がある。血糖値の測定は、たとえば使い捨てとして構成されたグルコースセンサを用いて行われている(たとえば特許文献1参照)。この文献に記載のグルコースセンサを用いる方法では、血糖値の測定に際して穿刺装置を用いて皮膚から血液を採取する必要がある。そのため、糖尿病患者にとっては、血糖値をモニタリングする作業は煩わしく、血糖値の測定毎に皮膚に針を突き刺す必要があるために苦痛を伴う。

[0003] このような不具合を解決すべく、継続的に血糖値をモニターすることができる血糖値測定手法が提案されており(たとえば特許文献2参照)、また米国においては、シグナス社より「グルコウオッチ」として製品化されている。先の血糖値測定手法では、皮膚から採取した血液や間質液を電極に供給し、この電極を利用してグルコース濃度を測定する電極法が採用されている。この場合の電極は、血糖値測定時において皮膚のごく近傍に配置され、また電極としては、グルコースオキシダーゼ(GOD)を介して血液や間質液から取り出した電子を、電極(導体成分)に与えるように構成されている。

[0004] GODを使用した電極法では、試料(血液や間質液)における溶存酸素の影響を受けて測定精度が低下してしまうといった問題がある。また、GODを用いる方法では、GODがグルコースから取り出した電子を電極(導体成分)に与える場合に、一般に、過酸化水素を生成させて、この過酸化水素を介して電極(導体成分)に電子を与える方法、あるいは電子伝達物質(たとえばフェリシアン化カリウムなどの金属錯体)を媒体として電極(導体成分)に電子を与える方法が採用されている。いずれの方法においても、皮膚から採取した血液などを、皮膚と隔離された場所においてグルコース濃度を

測定する場合には人体に対する問題は殆どない。しかしながら、過酸化水素やフェリシアン化カリウムが人体にとって好ましくない物質であることに鑑みれば、先のモニタリング方法のように、皮膚のごく近傍においてGODを含んだ電極を存在させる測定方法は好ましくない。

[0005] さらに、電子伝達物質を使用する方法に関していえば、電子伝達物質を電極内に含有させ、あるいは電極表面に電子伝達物質を固定する必要があるが生じる。いずれにしても、電子伝達物質をGODとは別に準備して、それを電極に含有させることはコスト的に不利である。

[0006] 特許文献1: 日本国特公平8-10208号公報  
特許文献2: 日本国特表平9-503924号公報  
発明の開示

[0007] 本発明は、人体に悪影響を及ぼすことなく、コスト的に有利にグルコース濃度を測定できるようにすることを課題としている。

[0008] 本発明の第1の側面において提供されるグルコースセンサは、グルコース脱水素酵素を導体成分に固定化した電極を有しており、上記グルコース脱水素酵素は、フラビンアデニンジヌクレオチド(FAD)が補酵素として結合し、かつグルコース脱水素活性を有する触媒活性サブユニットと、上記触媒活性サブユニットから供与された電子を、上記導体成分に授与するための電子伝達サブユニットと、を含むタンパク質複合体であることを特徴としている。

[0009] 本発明の第2の側面において提供されるグルコース濃度測定装置は、皮下組織から採取した血液または間質液に基づいて、グルコースの濃度を連続的に、あるいは複数回のグルコース濃度の測定を継続的に行うことができるように構成されたグルコース濃度測定装置であって、グルコース脱水素酵素を導体成分に固定化した電極を有するグルコースセンサと、上記血液または間質液と上記電極との間の電子授受量に相関した応答量を測定するための測定部と、上記測定部での測定結果に基づいてグルコース濃度を演算する演算部と、上記演算部においてグルコース濃度を演算するタイミングを制御する制御部と、を備えており、かつ、上記グルコース脱水素酵素

は、フラビンアデニンジヌクレオチドが補酵素として結合し、かつグルコース脱水素活性を有する触媒活性サブユニットと、上記触媒活性サブユニットから供与された電子を、上記導体成分に授与するための電子伝達サブユニットと、を含むタンパク質複合体であることを特徴としている。

[0010] グルコース脱水素酵素としては、ブルクホルデリア属に属する微生物に由来するものを使用するのが好ましい。

[0011] ここで、本発明でいうブルクホルデリア属に属する微生物は、グルコース脱水素活性を有する $\alpha$ サブユニット(触媒活性サブユニット)、またはチトクロムC( $\beta$ サブユニット)を含む酵素(以下、単に「GDH」ということがある)を産出できるものであれば特に限定されないが、その中でもブルクホルデリア・セパシア、とくにブルクホルデリア・セパシアKS1株(以下、単に「KS1株」ということがある)を用いるのが好ましい。

[0012] KS1株は、温泉付近の土壌から分離した新規菌株であるが、その菌学的性質からブルクホルデリア・セパシアであると同定されており、平成12年9月25日に独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター(〒305-8566 日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6)に微生物受託番号第FERM BP-7306として寄託されている。KS1株は、その詳細については、国際公開WO02/36779号公報に開示されているが、触媒活性サブユニットである $\alpha$ サブユニット(分子量約60kDa)、電子伝達サブユニットであるチトクロムCに相当する $\beta$ サブユニット(分子量約43kDa)および $\gamma$ サブユニット(分子量約14kDa)を含むGDHを産出することができる。ただし、分子量は、還元条件下でのSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動において測定したものである。

[0013] なお、本願の特許請求の範囲においては、由来菌により $\alpha$ サブユニット、チトクロムC( $\beta$ サブユニット)あるいは $\gamma$ サブユニットを特定することがあるが、これは各サブユニットを特定するための便法に過ぎない。すなわち、目的とするサブユニットの発現コードを含むベクターを宿主に移入して形質転換し、この形質転換体から産出されるGDHをグルコース脱水素酵素として使用する場合であっても、相違点がGDH(サブユニット)の起源のみしかないときには、本願発明の技術的範囲に属することを念のためにここで確認しておく。

[0014] 上記グルコースセンサは、たとえばグルコース濃度を連続的に測定し、あるいは複

数回のグルコース測定を継続的に行うことができるように構成することができる。この場合、グルコースセンサは、皮下組織から血液または間質液を採取するための採取要素をさらに備え、採取要素によって採取した血液または間質液を、電極に接触させることができるように構成される。

- [0015] 採取要素は、たとえば皮膚に突き刺すための中空の穿刺針と、この穿刺針を介して採取された血液または間質液を滞留させるための液溜部と、を備えたものとして構成される。この場合、液溜部に滞留させた血液または間質液を電極に接触させるように構成される。

液溜部は、たとえば電極および穿刺針に接触して配置された多孔質体として構成される。

- [0016] 上記グルコースセンサは、電極の少なくとも一部を、皮下組織に埋め込んで使用するように構成することもできる。この場合、電極は、たとえば可撓性を有する絶縁基板上に形成される。

#### 図面の簡単な説明

- [0017] [図1]本発明の第1の実施の形態におけるグルコース濃度測定装置を示す正面図である。

[図2]図1のII-II線に沿う断面図である。

[図3]図1および図2に示したグルコース濃度測定装置の分解斜視図である。

[図4]図1および図2に示したグルコース濃度測定装置のブロック図である。

[図5]本発明の第2の実施の形態におけるグルコース濃度測定装置を示す斜視図である。

[図6]図5のVI-VI線に沿う断面図である。

[図7]実施例3において用いた測定システムの概略構成図である。

[図8]実施例1において、グルコース濃度を変化させたときの応答電流値の測定結果を示すグラフである。

[図9]実施例2において、グルコース濃度を変化させたときの応答電流値の測定結果を示すグラフである。

[図10]実施例3において、グルコース濃度を一定にしたときの応答電流値の経時変

化を測定した結果を示すグラフである。

[図11]実施例3において、グルコース濃度を変化させたときの応答電流値の測定結果を示すグラフである。

### 発明を実施するための最良の形態

- [0018] 図1に示したグルコース濃度測定装置X1は、腕などの皮膚に密着させて使用するものであり、グルコース濃度測定を連続的に行い、あるいは複数回のグルコース濃度測定を継続して行えるように構成されている。図2および図3に示したように、グルコース濃度測定装置X1は、筐体1およびグルコースセンサ2を有している。
- [0019] 筐体1は、たとえばバンド10(図1参照)を用いて腕などに固定されるものであり、凹部11、表示部12、一対のコネクタピン13a,13bおよび図外の制御回路を有している。凹部11は、グルコースセンサ2を着脱自在に収容するためのものである。表示部12は、主として測定結果を表示するためのものであり、LCDなどにより構成されている。コネクタピン13a,13bは、後述するグルコースセンサ2の作用極32または対極33に接触させるためのものである。コネクタピン13a,13bは、グルコースセンサ2の作用極32と対極33との間に電圧を印加するために、あるいは電圧印加時の応答電流を測定するために利用されるものである。
- [0020] グルコースセンサ2は、互いに接合されたセンサ本体3および試料採取部材4を備えており、これらを一体として筐体1に対して着脱自在とされている。このグルコースセンサ2は、たとえば使い捨てとして構成されている。もちろん、センサ本体3と試料採取部材4とを個別に筐体1に対して着脱自在とし、センサ本体3および試料採取部材4を個別に交換するように構成することもできる。
- [0021] センサ本体3は、絶縁基板30の下面31に作用極32および対極33を形成したものである。絶縁基板30には、一対の貫通孔30a,30bが設けられている。貫通孔30aは作用極32を露出させるためのものであり、貫通孔30bは対極33を露出させるためのものである。すなわち、センサ本体3は、グルコースセンサ2を筐体1の凹部11に収容させた状態では、コネクタピン13aが作用極32に接触し、コネクタピン13bが対極33に接触し得るように構成されている。

- [0022] 作用極32は、導体成分およびグルコースデヒドロゲナーゼ(GDH)を含んでおり、グルタルアルデヒドなどの架橋剤によって絶縁基板30に固定されている。
- [0023] 導体成分は、たとえばカーボン粉末により構成されており、その含有量は、たとえば5〜100mgとされる。もちろん、導体成分としては、カーボン以外の導体粉末、あるいは多孔質に形成された導体(たとえば導体粉末の焼結体)を使用することもできる。
- [0024] GDHとしては、グルコース脱水素活性を有する触媒活性サブユニットおよび電子伝達サブユニットが互いに結合したタンパク質複合体が使用される。
- [0025] 触媒活性サブユニットは、試料中のグルコースから電子を取り出し、この電子を電子伝達サブユニットに供与する役割を果たすものであり、補酵素としてフラビンアデニンジヌクレオチド(FAD)を有するものが使用される。したがって、電子伝達サブユニットに対しては、還元型FADを介して、触媒活性サブユニットからの電子が供与される。
- [0026] 触媒活性サブユニットの含有量は、たとえば活性に換算して5〜100Uに相当する量とされる。ここで、酵素1単位(1U)は、標準検定条件(pH6.0、37℃)の下でDCIP(2,6-ジクロロフェノールインドフェノール)の還元にもとづく退色を、DCIPの吸収波長である600nmにおいて経時的に計測したときに、1分ごとに1  $\mu$  M グルコースを酸化する量(モル吸光係数は $4.76 \times 1000 \mu \text{M} / \text{cm}$ )として定義される。
- [0027] 一方、電子伝達サブユニットは、触媒活性サブユニットから授与された電子を、導体成分に供与する役割を果たすものである。電子伝達サブユニットとしては、たとえばチトクロムCが使用される。
- [0028] 触媒活性サブユニットおよび電子伝達サブユニットとしては、ブルクホルデリア属に属する微生物、たとえばKS1株に由来するタンパク質複合体を使用するのが好ましい。KS1株由来のGDHは、触媒活性サブユニットとして機能する $\alpha$ サブユニット(還元条件下でのSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動における分子量が約60kDa)、電子伝達タンパク質である $\beta$ サブユニット(還元条件下でのSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動における分子量が約43kDa)、および $\gamma$ サブユニット(還元条件下でのSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動における分子量が約14kDa)が結合した3量体として、あるいは $\alpha$ サブユニットと $\beta$ サブユニットからなる2量体として生成される。もちろん、GDHとしては、 $\alpha$ サブユニット、 $\beta$ サブユニットおよび $\gamma$ サブユニットをコードするDNAを移



入した形質転換体によって生成させたタンパク質複合体を使用することもできる。

- [0029] 上記微生物あるいは形質転換体によって目的とするGDHを取得する場合には、それらのサブユニット(タンパク質)を個別に精製し、あるいはそれらを個別に準備する必要がなく、さらには電子伝達物質をGDHとは別に作用極32に含有させる必要がないため、それらの点においてコスト的に有利である。
- [0030] 対極33は、たとえばカーボンペーストをスクリーン印刷により形成することができる。もちろん、対極33は、カーボン以外の導体成分により形成することができ、スクリーン印刷以外の手法により形成することもできる。
- [0031] 試料採取部材4は、皮膚から試料(血液または間質液)を採取するためのものであり、絶縁基板40、穿刺針41、および液吸収体42を有している。
- [0032] 絶縁基板40は、穿刺針41および液吸収体42を固定するためのものであり、その下面40aには、両面に接着性を有する粘着テープ43が貼着されている。これにより、絶縁基板40ひいてはグルコースセンサ2を皮膚Skに密着して固定することができる。穿刺針41は、皮膚に突き刺して試料を採取するための部分であり、中空状に形成されている。この穿刺針41は、絶縁基板40を貫通し、絶縁基板40の上面において開放されている。液吸収体42は、穿刺針41によって採取された試料を保持するためのものであり、穿刺針41の上端を覆うように配置されている。この液吸収体42は、筐体1にグルコースセンサ2を収容した状態では、センサ本体3の作用極32および対極33に接触する。液吸収体42は、たとえば多孔質体として形成されている。多孔質体としては、たとえば織布、不織布、編布、あるいは発泡体を使用することができる。なお、液吸収体42に代えて、採取した試料を保持するための空間を設けてもよい。
- [0033] グルコース濃度測定装置X1は、上述の要素に加えて、図4に示したように電圧印加部14、電流値測定部15、演算部16および制御部17を備えている。
- [0034] 電圧印加部14は、作用極32および対極33に電圧を印加するためのものであり、図面上には表れていないが、コネクタピン13a,13b(図2参照)に導通接続されている。
- [0035] 電流値測定部15は、作用極32と対極33との間に電圧を印加したときの応答電流値を測定するためのものである。
- [0036] 演算部16は、電流値測定部15において測定された応答電流値に基づいて、試料

中のグルコース濃度を演算するためのものである。

- [0037] 制御部17は、各部12, 14〜16の動作を制御するためのものである。より具体的には、電流値測定部15を制御して応答電流値を測定するタイミングを制御し、演算部16を制御してグルコース濃度を演算させ、あるいは表示部12を制御して表示部12での表示内容を制御する。
- [0038] 図2によく表れているように、グルコース濃度測定装置X1では、グルコースセンサ2を皮膚Skに固定した上で、筐体1によってグルコースセンサ2を覆うことにより、グルコース濃度測定を連続的にを行い、あるいは複数回のグルコース濃度測定を継続的に行うことができる。グルコースセンサ2を皮膚Skに固定した場合には、試料採取部材4の穿刺針41が皮膚Skに突き刺さっている。穿刺針41が中空に形成されていることから、液吸収体42には、穿刺針41を介して試料が供給される。この状態では、液吸収体42と皮下組織との間が液絡しているために、皮下組織におけるグルコース濃度が変化した場合には、皮下組織でのグルコース濃度と平衡を保つために、液吸収体42でのグルコース濃度が変化する。すなわち、液吸収体42でのグルコース濃度は、皮下組織におけるグルコース濃度を反映したものとなる。
- [0039] 一方、液吸収体42は、作用極32と接触している。そのため、試料中のグルコースからは、作用極32の触媒活性サブユニットによって電子が取り出される。この電子は、電子伝達サブユニットに供与される。作用極32と対極33との間には、図4に示した電圧印加部14を介して継続的に電位差が与えられている。これは、電子伝達サブユニットに必要以上に電子が蓄積されるのを抑制し、リアルタイムで応答電流値を測定するためである。電子伝達サブユニットに供与された電子は、作用極32と対極33との間に電位差が与えられることによって、導体成分に供与される。作用極32は、コネクタピン13aを介して電流値測定部15に接続されているため、電流値測定部15においては、電子伝達サブユニットから供与された電子の量が応答電流値として測定される。
- [0040] 図4に示した制御部17は、連続的または一定時間毎(たとえば5分〜2時間毎)に応答電流値をサンプリングするとともに、演算部16に対して、サンプリングされた応答電流値に基づいてグルコース濃度を連続的または一定時間毎に演算させる。演算部16においては、予め調べられた検量線に対して、測定された応答電流値を当てはめ

ることによりグルコース濃度が演算される。グルコース濃度の演算が終了した場合には、制御部17は、表示部12に対して演算部16における濃度演算結果を表示させる。

[0041] グルコースセンサ2では、作用極32において、酵素として、触媒活性サブユニットに対して電子伝達サブユニットが結合(サブユニット化)したGDHが含有をさせられている。このため、作用極32においては、触媒活性を有するタンパク質(触媒活性サブユニット)の周りに、作用極32に対して電子を伝達する機能を有するタンパク質(電子伝達サブユニット)が均一に存在する環境が作り出されている。すなわち、触媒活性を有するタンパク質(触媒活性サブユニット)に対して、分子数で等量の電子伝達タンパク質(電子伝達サブユニット)が密着した状態で存在する。その結果、グルコースセンサ2では、触媒活性タンパク質と触媒電子伝達タンパク質との間の反応速度(電子授受速度)を大きくして応答感度を高めるとともに、安定した応答電流の測定を行うことができる。

[0042] 次に、本発明の第2の実施の形態について、図5および図6を参照して説明する。

[0043] 図5および図6に示したグルコース濃度測定装置X2は、先に説明した本発明の第1の実施の形態に係るグルコース濃度測定装置X1と同様に、バンドや粘着テープを利用して腕などの皮膚Skに密着させて使用するものである(図1参照)。このグルコース濃度測定装置X2は、グルコース濃度測定を連続的に行い、あるいは複数回のグルコース濃度の測定を継続して行うことが可能なように構成されており、グルコースセンサ5および筐体6を有している。

[0044] グルコースセンサ5は、筐体6に対して着脱自在とされており、たとえば使い捨て可能なように構成されている。このグルコースセンサ5は、絶縁基板50上に作用極51および対極52が形成された形態を有している。絶縁基板50は、皮膚Skに突き刺すための細幅部分50aを有するとともに、ポリイミド樹脂などにより可撓性を有するものとして形成されている。作用極51および対極52は、端子部51a,52aを有している。作用極51および対極52は、先に説明したグルコースセンサ2の作用極32および対極33(図3参照)と同様にして形成されている。

[0045] 筐体6は、第1および第2部材61,62を有しており、これらの部材61,62の間には、空間63が形成されている。空間63は、グルコースセンサ5を保持するためのものである。

- [0046] 第1部材61には、表示部64および一対のコネクタピン65a,65bが設けられている。表示部64は、各種の情報を表示するためのものであり、たとえばLCDにより構成されている。コネクタピン65a,65bは、図外の制御回路に繋がっており、空間63にグルコースセンサ5を保持した状態においては、作用極51および対極52の端子部51a,52aに接触するように構成されている。この状態においては、コネクタピン65a,65bを利用して作用極51および対極52の間への電圧の印加が可能であり、また電圧印加状態においては電流値の測定が可能となる。一方、第2部材62には、絶縁基板50の細幅部分50aを外部に突出させるための開口部66が形成されている。
- [0047] このようなグルコース濃度測定装置X2では、筐体6にグルコースセンサ5を保持させた状態において、絶縁基板50の細幅部分50aを皮膚Skに突き刺すことにより、連続的にグルコース濃度測定を行い、あるいは複数回のグルコース濃度測定を継続的に行うことが可能となる。
- [0048] 皮膚Skに絶縁基板50の細幅部分50aを突き刺した状態においては、作用極51において血液または間質液のグルコースから電子が取り出される。この電子は、電子伝達サブユニットに供与される。電子伝達サブユニットに供与された電子は、作用極51および対極52の間に電位差を与えることにより作用極51の導体成分に供与される。このときに供与された電子の量は、コネクタピン65a,65bを介して応答電流値として測定することができる。グルコース濃度測定装置X2においては、連続的または一定時間毎(たとえば5分〜2時間毎)に応答電流値をサンプリングするとともに、サンプリングされた応答電流値に基づいてグルコース濃度が連続的または一定時間毎に演算される。演算結果は、表示部64において表示される。
- [0049] グルコースセンサ5においても、作用極51が触媒活性サブユニットおよび電子伝達サブユニットが結合したタンパク質複合体を含んだものとなっている。そのため、グルコースセンサ5が人体に対して悪影響を与えることはなく、また安定した応答電流の測定をコスト的に有利に行うことができる。
- [0050] [実施例1]
- 本実施例においては、酵素電極の応答特性について、バッチ式の反応槽を用いて

検討した。

- [0051] 酵素電極は、プラスチックチューブ(直径5mm、長さ30mm)の内部に、酵素とカーボン粉末を固定化した構成とした。酵素およびカーボン粉末の固定化は、酵素とカーボンペース(20mg)の混合物をプラスチックチューブに充填した後に、プラスチックチューブの内部に、架橋剤としての1%グルタルアルデヒドを含む100mMのリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.0)を30分間含浸させることにより行った。架橋剤における過剰なアルデヒド基は、10mMのTris-HCl中で20分間処理することにより不活性化した。酵素電極は、使用する前に、100mMのリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.0)に浸漬して平衡化しておいた。酵素としては、KS1株由来の $\alpha$ サブユニット(触媒活性サブユニット)、 $\beta$ サブユニット(電子伝達サブユニット)および $\gamma$ サブユニットからなるCyGDH(92.1U/mg)、またはKS1株由来の $\alpha$ サブユニット(触媒活性サブユニット)および $\gamma$ サブユニットからなる $\alpha$ GDH(21.3U/mg)を使用し、2種類の酵素電極を作成した。酵素電極においては、酵素の含有量を10Uに相当する量とした。
- [0052] 応答特性は、濃度の異なる複数のグルコース溶液について、応答電流を測定した結果に基づいて検討した。応答電流値は、目的濃度に調整されたグルコース溶液を保持した反応槽に対して、酵素電極、参照電極および対極を浸漬するとともに、酵素電極と対極との間に電圧を印加し、参照電極を基準電極として測定した。グルコース溶液は、グルコースを100mMのリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.0)に溶解させることにより作成した。グルコース溶液の濃度は、0mM、0.5mM、1.0mM、1.5mM、2.0mM、2.5mM、8mM、12mM、21mM、30mMおよび47mMに設定した。参照電極としてはAg/AgCl電極を用い、対極としてはPt電極を用いた。印加電圧値は+400mVとし、応答電流値の測定は、反応槽の温度を25℃または37℃に維持して行った。応答電流値の測定結果については、図8に示した。
- [0053] 図8から分かるように、 $\beta$ サブユニット(電子伝達サブユニット)を有しない $\alpha$ GDHを用いた酵素電極では、グルコース濃度の増加に伴う応答電流値の増加量が小さく、作用極における導体成分と $\alpha$ サブユニットとの間で、適切な電子伝達が行われていないことが伺える。これに対して、 $\beta$ サブユニットを有するCyGDHを用いた酵素電極では、グルコース濃度の増加に伴う応答電流値の増加量が大きく、良好な応答特性

が得られている。すなわち、 $\beta$  サブユニットを  $\alpha$  サブユニットに結合(サブユニット化)させることにより、作用極における導体成分と  $\alpha$  サブユニットとの間で、適切な電子伝達が行われていることが伺える

。このような傾向は、測定温度を25℃および37℃に設定した場合のいずれにおいても伺える。したがって、電子伝達タンパク質が結合したGDHを用いた酵素電極では、金属錯体などの電子伝達物質を用いることなく、電極法において、グルコース濃度の測定を行うことができる。

[0054] [実施例2]

本実施例においては、印加電圧が酵素電極の応答特性に与える影響について、バッチ式の反応槽を用いて検討した。酵素電極は、基本的には実施例1と同様にしして作成した。ただし、酵素としては、比活性56.5U/mgであるCyGDHを用い、また酵素電極における酵素の含有量を50Uに相当する量とした。応答特性については、目的濃度のグルコース溶液を37℃に維持し、印加電圧を+400mVおよび+250mVとした場合のそれぞれについて、応答電流値を測定した結果に基づいて検討した。グルコース溶液の濃度は、0mM、0.5mM、1.0mM、1.5mM、2.0mM、2.5mM、8mM、12mM、21mM、および47mMに設定した。応答電流値の測定結果については、図9に示した。

[0055] 図9から分かるように、印加電圧値が+250mVの場合には、印加電圧値が+400mVの場合に比べて応答電流値が小さくなっているものの、印加電圧値が+400mVおよび+250mVのいずれの場合においても適切に応答電流値を測定できるといえる。したがって、電子伝達タンパク質が結合したGDHを用いた場合には、印加電圧値が比較的小さくても適切に応答電流値を測定し、グルコース濃度を測定することができる。この結果は、連続的あるいは継続的な血糖値モニターを行う場合のように、連続的に電圧を印加する必要がある場合に、あるいは連続的または継続的な血糖値モニターを行うためのグルコース濃度測定装置を、電池によって駆動する場合に、優位に作用する。

[0056] [実施例3]

本実施例においては、酵素電極を用いての連続的なグルコース濃度のモニターの

可能性について、フローセルを用いて検討した。具体的には、(1)72時間の連続モニター試験、(2)作成初期(未使用)の酵素電極と、72時間の連続モニターに使用後の酵素電極の応答特性について検討した。

[0057] (1)連続モニター試験

連続モニター試験は、図7に概略構成を示した測定システム7を用いて行った。この測定システム7は、反応セル70に、酵素電極71、参照電極72および対極73を保持させ、反応セル70の内部にグルコース溶液を供給したときに、これらの電極71-73がグルコース溶液に接触するように構成されたものである。各電極71-73は、ポテンシオスタット74に接続されている。反応セル70には、流路75が規定されており、反応セル70は、グルコース溶液を連続的に供給・排出可能なフローセルとして構成されている。反応セル70には、目的とする濃度のグルコース溶液が保持された容器76から、ポンプ77の動力を介してグルコース溶液が連続的に供給されるように構成されている。測定システム7では、酵素電極71として実施例2と同様にして作成したもの、参照電極72としてフローセル用のAg/AgCl電極、対極73としてはステンレスチューブが用いられている。

[0058] 応答電流値は、酵素電極71と対極73との間に電圧を印加するとともに、参照電極72を基準電極として測定した。印加電圧値は+250mVとした。応答電流値の測定は、反応セル70に対して5mMのグルコース溶液(pH7.0)を0.1ml/minの流速で連続的に供給するとともに、グルコース溶液の温度を37℃に維持した状態において、連続的に測定した。応答電流値の経時変化については、図10に示した。図10においては、縦軸の応答電流を、測定時間が「0」のときの値を100とした相対値として示してある。

[0059] (2)使用前後の酵素電極の応答特性

使用前(0h)および使用後(72h)の酵素電極の応答特性は、図7に示した測定システム7を用いて、目的濃度のグルコース溶液を37℃に維持した状態において0.5ml/minの流速で供給し、印加電圧を+250mVとして測定した応答電流値に基づいて検討した。グルコース溶液は、0mM、0.5mM、1.0mM、2.5mM、10.0mM、15.0mM、20.0mMおよび25mMの順に段階的上昇させた後、先とは逆に段階的に濃度を減少させて供給した。応答電流値の測定結果については、図11に示した。

- [0060] 図10から分かるように、72時間の連続モニター試験においては、応答電流値が経時的に低下しているものの、72時間後においても一定量の応答電流値が測定されている。一方、図11から分かるように、72時間の連続モニターに使用した後の酵素電極は、使用前の酵素電極に比べて応答特性が悪くなっているが、グルコース濃度を測定するのに十分な応答特性を有している。これらの結果は、電子伝達タンパク質が結合したGDHを用いた酵素電極においては、72時間の連続モニター試験後においてもGDHが十分な残存活性を有しており、たとえばCyGDHを用いた酵素電極を用いて連続モニターが可能であることを示唆している。
- [0061] すなわち、酵素電極での応答電流値の経時的劣化を予め調べておいた上で、経時劣化の予測に基づいて、測定値や演算値を補正すれば、連続モニターが可能となる。また、酵素電極を改良して経時劣化を抑制するようにすれば、連続モニターが可能となる。さらには、酵素電極の経時的劣化に伴う応答電流値の減少分を、印加電圧を経時的に増加させて応答電流値を強制的に増大させて相殺すること、すなわち図11に示した応答電流値が一定値で推移するように印加電圧を制御することにより、連続モニターが可能となる。
- [0062] 連続モニター試験からは、次の知見も得られる。すなわち、最初の18時間程度の間の応答電流値の減少量が大きく、その後の応答電流値は比較的安定している。したがって、酵素電極(グルコースセンサ)をある程度意図的に劣化させた後に実際のグルコース濃度測定を行うといった使用方法も考えられる。
- [0063] また、図11から分かるように、使用前(0h)および使用後(72h)の酵素電極(グルコースセンサ)は、グルコース濃度を上昇させる過程(0mM→25mM)とグルコース濃度を減少させる過程(25mM→0mM)との間に良好な相関関係が見受けられる。このことは、血糖値を連続的にモニターする場合のように、グルコース濃度が経時的に変動する環境下において、適切にグルコース濃度を測定できることを意味している。



## 請求の範囲

- [1] グルコース脱水素酵素を導体成分に固定化した電極を有しており、  
上記グルコース脱水素酵素は、フラビンアデニンジヌクレオチドが補酵素として結合し、かつグルコース脱水素活性を有する触媒活性サブユニットと、上記触媒活性サブユニットから供与された電子を、上記導体成分に授与するための電子伝達サブユニットと、を含むタンパク質複合体であることを特徴とする、グルコースセンサ。
- [2] 上記グルコース脱水素酵素は、ブルクホルデリア属に属する微生物に由来するものである、請求項1記載のグルコースセンサ。
- [3] 上記電子伝達サブユニットは、チトクロムCである、請求項2に記載のグルコースセンサ。
- [4] 上記触媒活性サブユニットは、還元条件下でのSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動における分子量が約60kDaであり、上記チトクロムCは、還元条件下でのSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動における分子量が約43kDaである、請求項3に記載のグルコースセンサ。
- [5] 上記グルコース脱水素酵素は、還元条件下でのSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動における分子量が約14kDaである $\gamma$ サブユニットをさらに含んでいる、請求項4に記載のグルコースセンサ。
- [6] グルコース濃度を連続的に測定し、あるいは複数回のグルコース濃度の測定を継続的に行うことができるように構成されている、請求項1に記載のグルコースセンサ。
- [7] 皮下組織から血液または間質液を採取するための採取要素をさらに備えており、  
上記採取要素によって採取した血液または間質液を、上記電極に接触させることができるように構成されている、請求項6に記載のグルコースセンサ。
- [8] 上記採取要素は、皮膚に突き刺すための中空の穿刺針と、この穿刺針を介して採取された血液または間質液を滞留させるための液溜部と、を備えており、  
上記液溜部に滞留させた血液または間質液を上記電極に接触させるように構成されている、請求項7に記載のグルコースセンサ。
- [9] 上記液溜部は、上記電極および上記穿刺針に接触して配置された多孔質体である、請求項8に記載のグルコースセンサ。

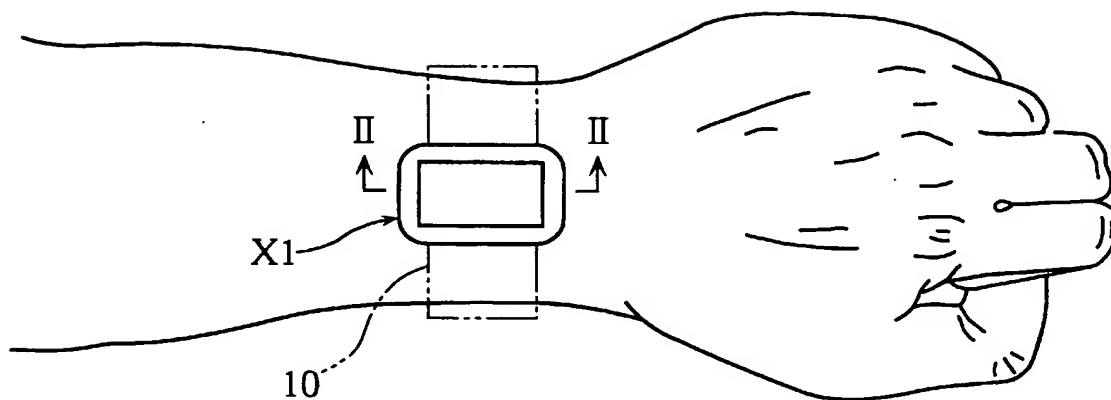
- [10] 上記電極の少なくとも一部を、皮下組織に埋め込んで使用するよう構成されている、請求項6に記載のグルコースセンサ。
- [11] 上記電極は、可撓性を有する絶縁基板上に形成されている、請求項10に記載のグルコースセンサ。
- [12] 皮下組織から採取した血液または間質液に基づいて、グルコースの濃度を連続的に、あるいは複数回のグルコース濃度の測定を継続的に行うことができるよう構成されたグルコース濃度測定装置であって、  
グルコース脱水素酵素を導体成分に固定化した電極を有するグルコースセンサと、  
上記血液または間質液と上記電極との間の電子授受量に相関した応答量を測定するための測定部と、  
上記測定部での測定結果に基づいてグルコース濃度を演算する演算部と、  
上記演算部においてグルコース濃度を演算するタイミングを制御する制御部と、  
を備えており、かつ、  
上記グルコース脱水素酵素は、フラビンアデニンジヌクレオチドが補酵素として結合し、かつグルコース脱水素活性を有する触媒活性サブユニットと、上記触媒活性サブユニットから供与された電子を、上記導体成分に授与するための電子伝達サブユニットと、を含むタンパク質複合体であることを特徴とする、グルコース濃度測定装置。
- [13] 上記グルコース脱水素酵素は、ブルクホルデリア属に属する微生物に由来するものである、請求項12に記載のグルコース濃度測定装置。
- [14] 上記電子伝達サブユニットは、チトクロムCである、請求項13に記載のグルコース濃度測定装置。
- [15] 上記触媒活性サブユニットは、還元条件下でのSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動における分子量が約60kDaであり、上記チトクロムCは、還元条件下でのSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動における分子量が約43kDaである、請求項14に記載のグルコース濃度測定装置。
- [16] 皮下組織から血液または間質液を採取するための採取要素をさらに備えており、  
上記採取要素によって採取した血液または間質液を、上記電極に接触させることが

できるように構成されている、請求項12に記載のグルコース濃度測定装置。

- [17] 上記採取要素は、皮膚に突き刺すための中空の穿刺針と、この穿刺針を介して採取された血液または間質液を滞留させるための液溜部と、を備えており、  
上記液溜部に滞留させた血液または間質液を上記電極に接触させるように構成されている、請求項16に記載のグルコース濃度測定装置。
- [18] 上記液溜部は、上記電極および上記穿刺針に接触して配置された多孔質体である、請求項17に記載のグルコース濃度測定装置。
- [19] 上記電極の少なくとも一部を、皮下組織に埋め込んで使用するよう構成されている、請求項12に記載のグルコース濃度測定装置。
- [20] 上記電極は、可撓性を有する絶縁基板上に形成されている、請求項19に記載のグルコース濃度測定装置。

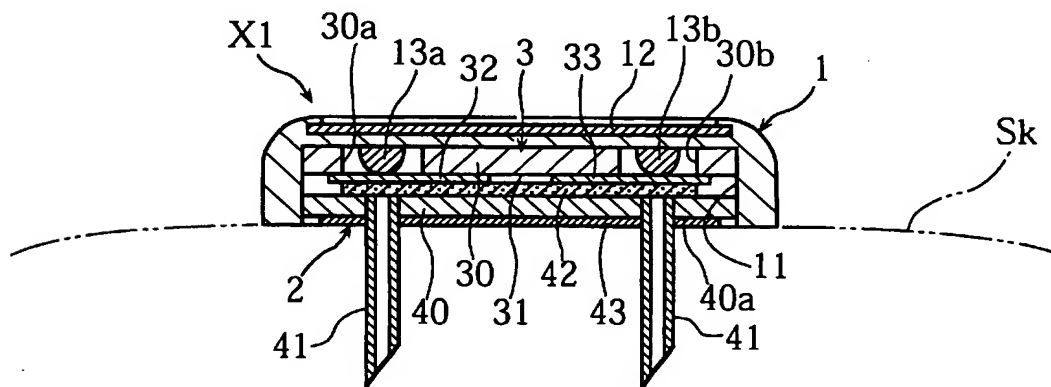
[図1]

FIG. 1



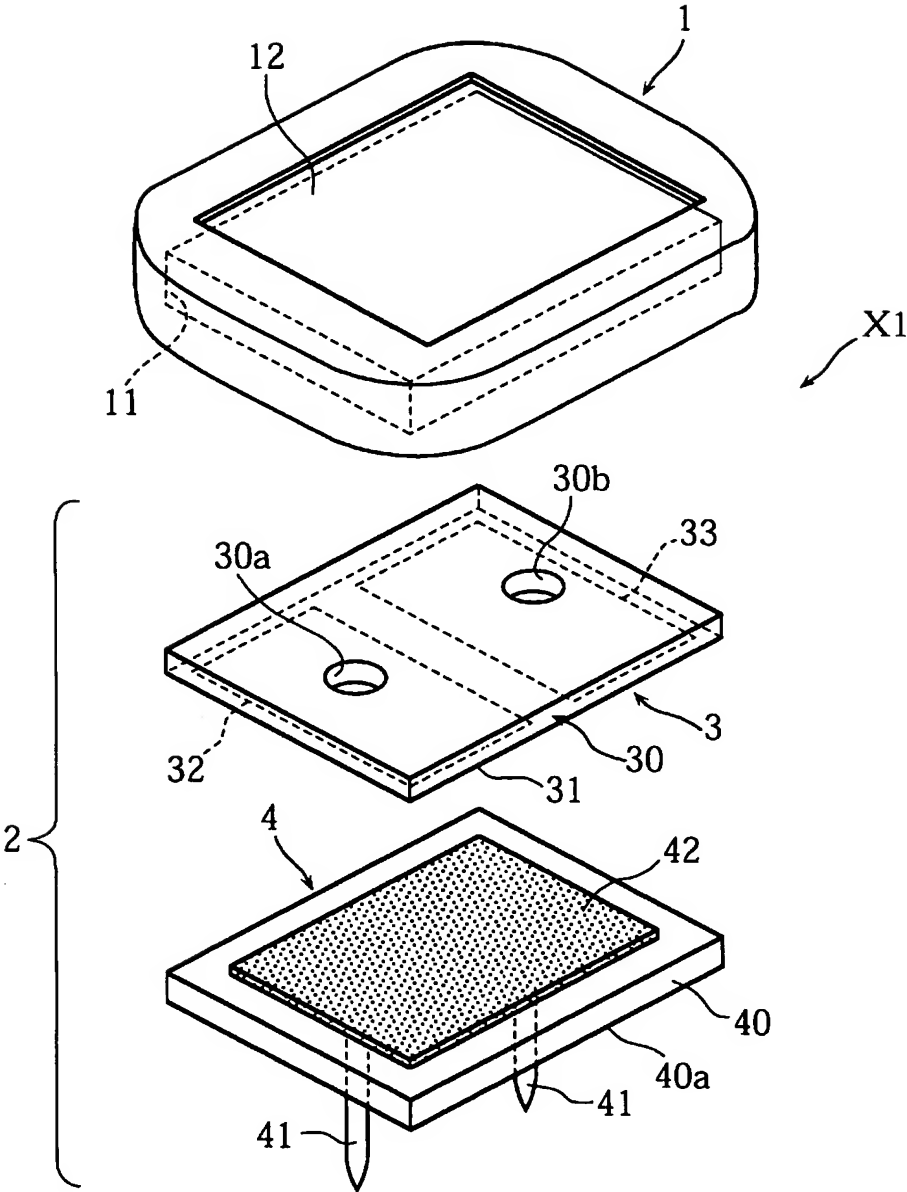
[図2]

FIG. 2



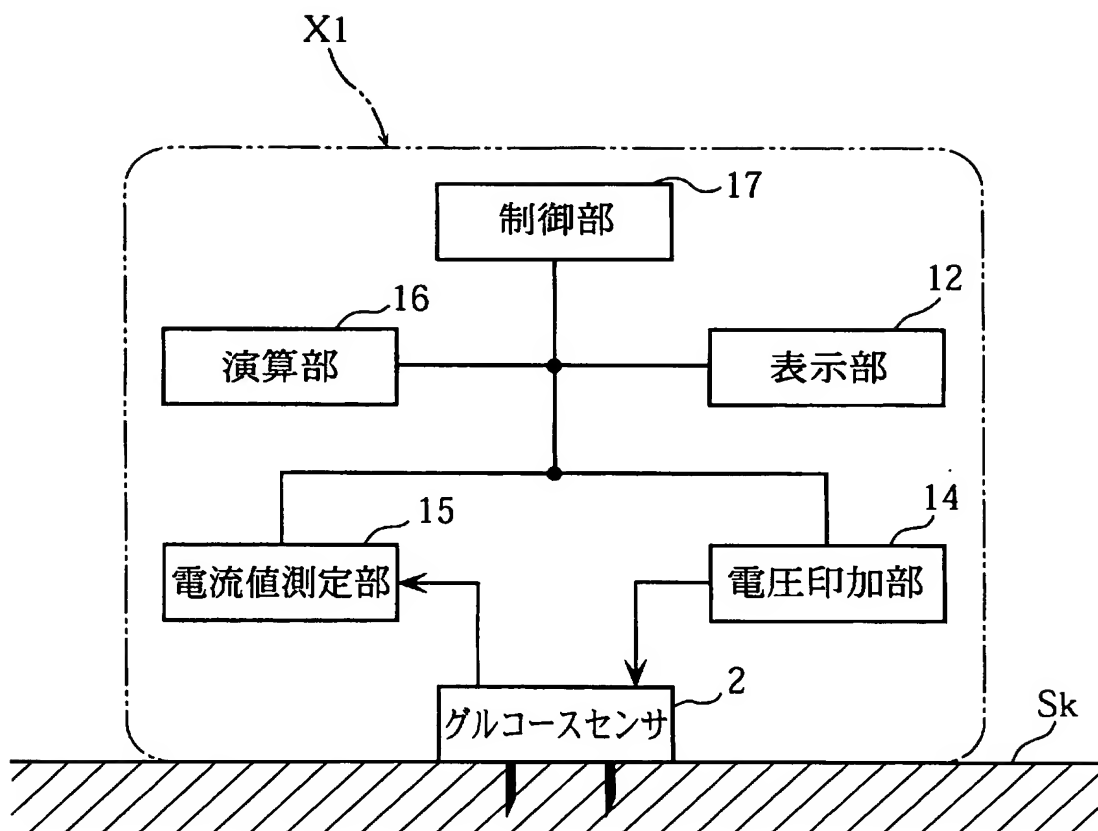
[図3]

FIG. 3



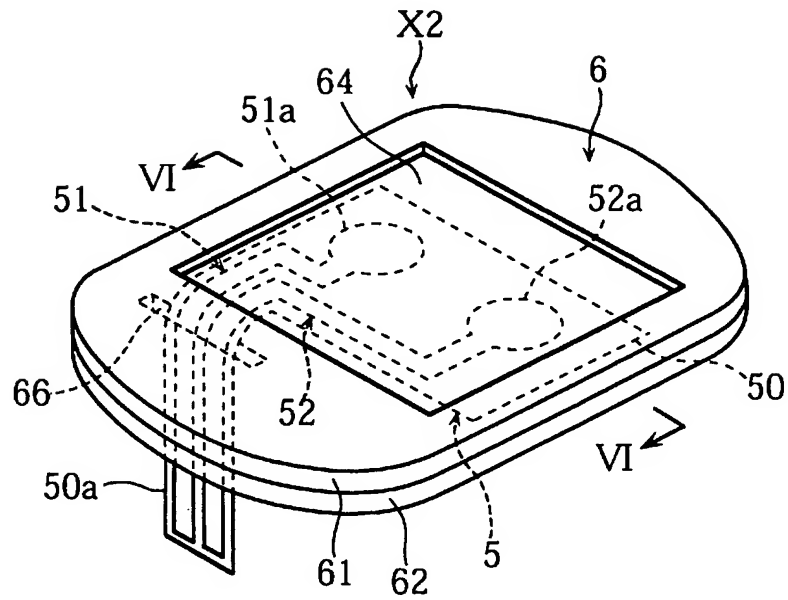
[図4]

FIG. 4



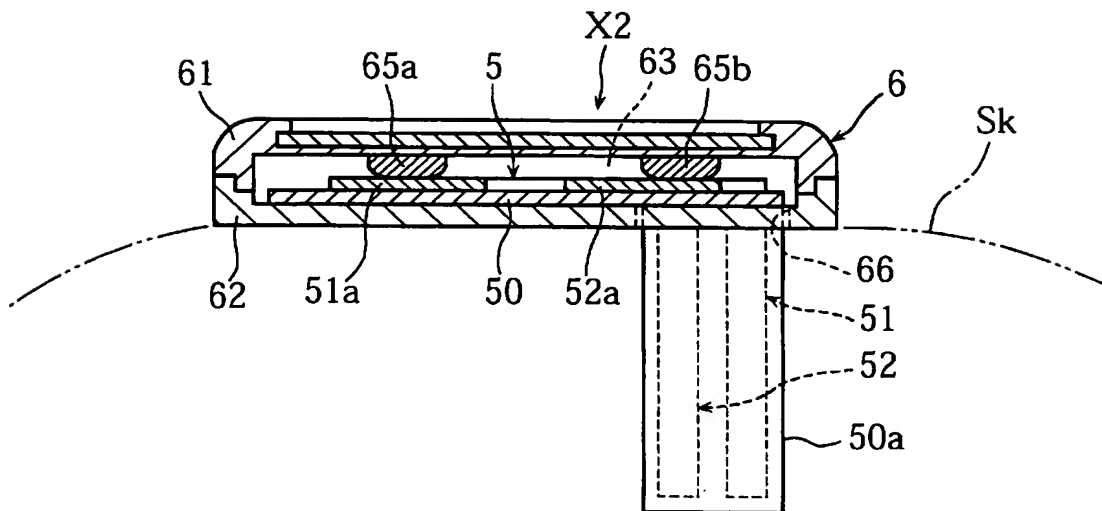
[図5]

FIG. 5



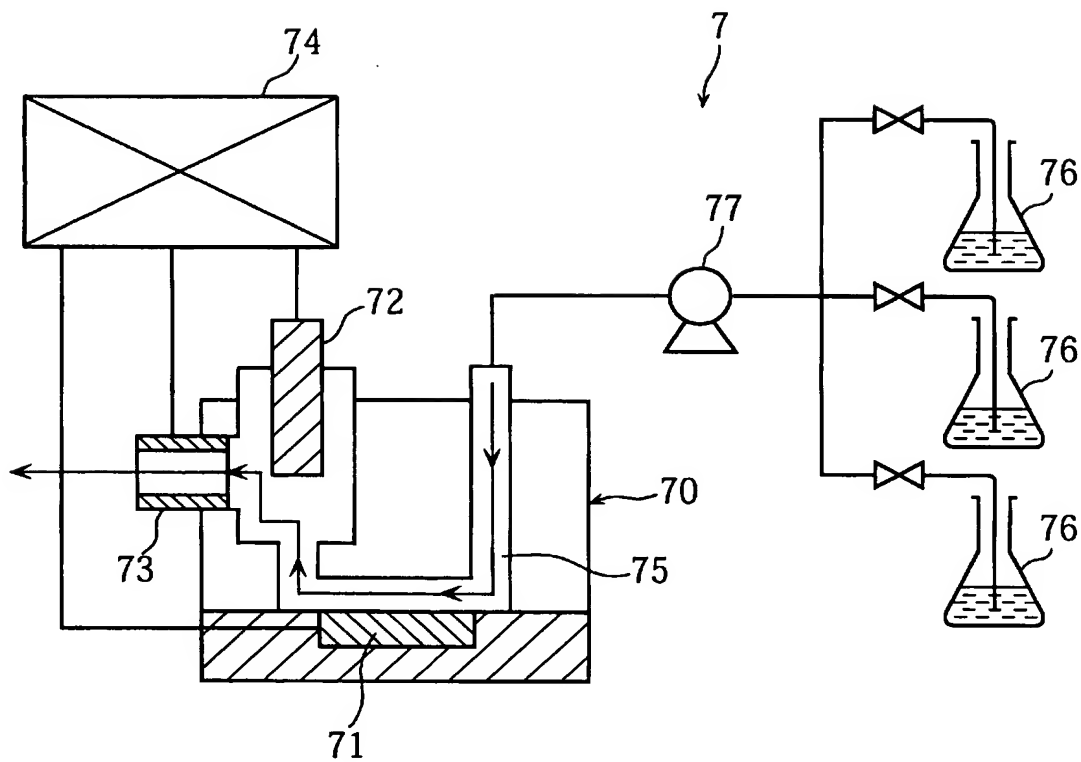
[図6]

FIG. 6



[図7]

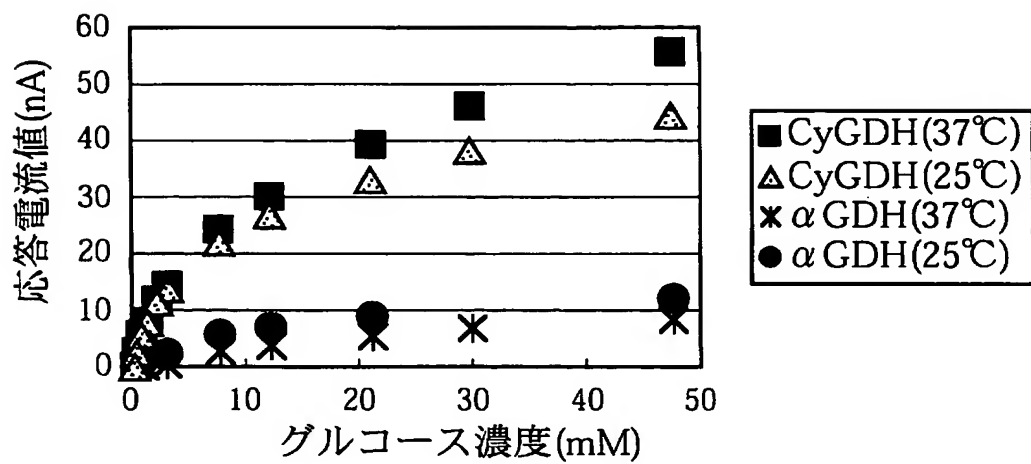
FIG. 7





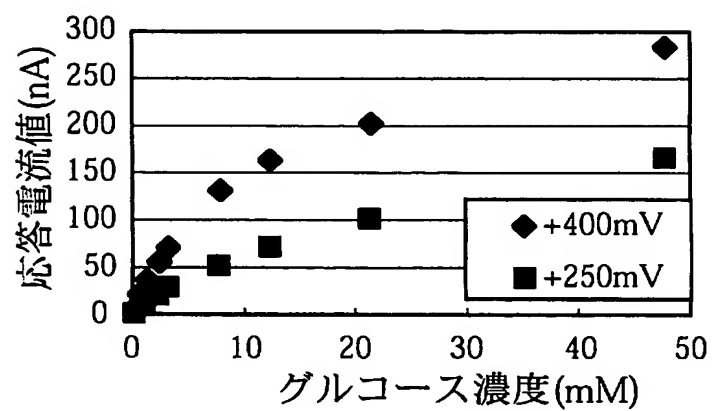
[図8]

FIG. 8



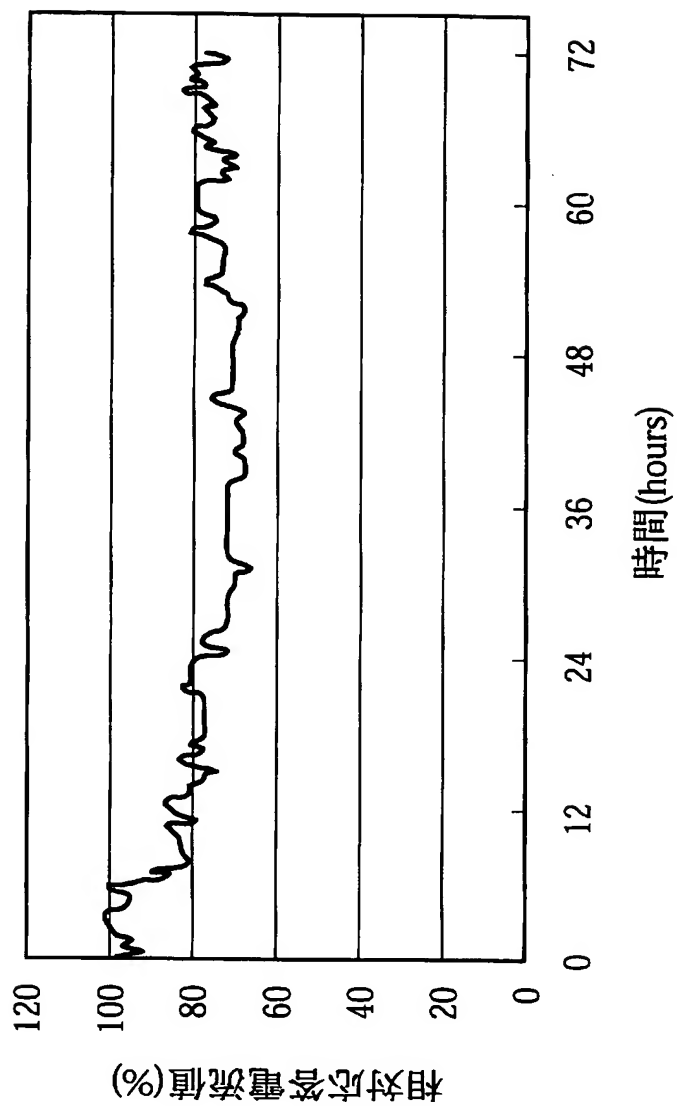
[図9]

FIG. 9



[図10]

FIG. 10



[図11]

FIG. 11

